

# BIOSENSORES

## LOS DISPOSITIVOS ANALÍTICOS DEL FUTURO (I)

Por L. M. LECHUGA Y A. CALLE\*

### RESUMEN

En un futuro próximo los biosensores tendrán un gran impacto en nuestra vida diaria. Los dispositivos analíticos del futuro, como se les ha denominado, combinan una membrana biológica de reconocimiento molecular en íntimo contacto con un transductor, formando un *biodispositivo* cuya naturaleza es única en química analítica y que pronto cubrirá las actuales necesidades de análisis rápidos, directos y fiables en el sector clínico, en el control medioambiental, en agricultura o en el control de procesos industriales. Un mercado actual de aproximadamente 100 millones de dólares y un potencial de 900 para el año 2000 explican el *boom* que supuso su descubrimiento. En este artículo se intenta dar una visión de conjunto sobre el mundo de los biosensores: su funcionamiento, sus principales aplicaciones, las ventajas de su utilización y su comercialización, haciendo especial hincapié en el papel que los materiales polímeros han tenido en el desarrollo, mejora y puesta a punto de los mismos.

### ABSTRACT

Biosensor will have an impact on people's daily lives in the not too distant future. The future analytical devices, as they are called, are formed by a biological recognition system

in intimate contact with an adequate transducer, giving place to a *biodevice* which is unique in analytical chemistry. These biodevices can fill very real needs in health care, environmental monitoring, agricultural field and industrial processes control. An actual market of about \$100 million and a potential market of \$900 million for the year 2000 are the main reasons to explain the *boom* of these devices. In this article, the authors will give an overview of biosensors: their way of function, their main applications, advantages and marketing, with special attention to the role that the polymeric materials have had in their development, performance and function.

### 1. ¿QUÉ ES UN BIOSENSOR?

Los biosensores, dispositivos analíticos de pequeño tamaño, hicieron su aparición en los años 60 cuando Clark y Lyons propusieron la inmovilización de una capa enzimática sobre detectores eléctricos construyendo de esta forma el primer *electrodo enzimático* (1). Los biosensores atrajeron inmediatamente una considerable atención como sustitutos de un amplio espectro de técnicas analíticas. Hoy, 30 años después, se han llegado a convertir en herramientas de análisis indispensables en numerosos campos de aplicación. Su espectacular desarrollo, tanto científico como comercial, está todavía en una prometedora etapa de crecimiento. Además, su naturaleza multidisciplinar les ha convertido en el punto de encuentro de diversos conocimientos científicos y tecnológicos: microelectrónica,

\* Centro Nacional de Microelectrónica (CSIC).  
Serrano, 144-28006 Madrid.



diferentes transductores ha dado lugar a una gran variedad de biosensores, algunos de ellos realmente ingeniosos. Veremos en las siguientes secciones con más detalle cada tipo de biosensor desarrollado y, en muchos casos, comercializado. Además, la irrupción de la tecnología microelectrónica durante el desarrollo de estos dispositivos supuso una espectacular innovación en cuanto a diseños y características. Los avances en biotecnología han proporcionado continuamente una mejora en los métodos de inmovilización de la biocapa y los avances puramente tecnológicos de la microelectrónica y las tecnologías de la información han proporcionado transductores cada vez más sofisticados y miniaturizados.

Una información más extensa sobre los biosensores se puede encontrar en diversas revisiones bibliográficas y excelentes libros sobre el tema (2-14).

## 2. ¿PORQUÉ UTILIZAR UN BIOSENSOR?

De la definición dada en el apartado precedente, deducimos que el concepto básico de biosensor es simple: se trata tan solo de unir una biocapa con un transductor adecuado para conseguir una «biotransducción» directa. Con los dispositivos así formados, se pueden simplificar muchos métodos analíticos, que suelen ser laboriosos, consumen mucho tiempo y en algunas ocasiones requieren personal especializado para su manejo. Los biosensores son fácilmente miniaturizables, dan señales directas y continuas, son baratos, permiten detecciones cuantitativas de bajísimas concentraciones y se pueden integrar en un

sistema de control. Estas son algunas de las ventajas de su utilización, pero muchas otras se hallan recogidas en la Tabla I, a partir de la cual es fácil deducir el porqué de su espectacular desarrollo desde su descubrimiento.

Por ejemplo, hoy en día la detección de pesticidas es un gran problema en el control del medio ambiente (15). Los pesticidas son moléculas que pueden llegar a ser tóxicas en concentraciones muy bajas (el límite máximo permitido por la Unión Europea en el agua corriente es tan sólo de 0.1 µg/l) lo que implica que se necesitan para su detección sofisticados métodos de análisis. Su determinación mediante biosensores está simplificando notablemente tanto el método de análisis, como el tiempo o el personal requerido para su realización.

## 3. ¿PARA QUÉ UTILIZAR UN BIOSENSOR?

Las aplicaciones potenciales son tan variadas como lo son las biosustancias específicas que pueden incorporar. Numerosas sustancias como son: drogas, toxinas, moléculas orgánicas (urea, glucosa, colesterol, antibióticos, etc.), explosivos, células vivas (células microbiales, *Candida Albicans*, B. linfocito), hormonas, péptidos, pesticidas y proteínas (albúmina, insulina, inmunoglobulinas, antígenos) o haptenos en general son susceptibles de ser detectadas mediante el uso de un biosensor. Por ello su aplicación fundamental se halla en el campo médico (16), pero no podemos olvidar su espectro de acción en otros campos como son medio ambiente, agricultura, control de procesos industriales, defensa y seguridad doméstica, por citar los

TABLA I.- VENTAJAS DE SU UTILIZACIÓN

- 
- Tienen una alta sensibilidad y selectividad.
  - Son pequeños, sencillos de manejar y baratos.
  - Permiten análisis muy rápidos. Drástica reducción del tiempo requerido en el proceso analítico.
  - Se pueden detectar analitos en concentraciones muy bajas, incluso cuando las sustancias interferentes están en concentraciones mucho más altas que la del analito en cuestión. Límite de detección ≤ 1 ppb.
  - Es posible determinar múltiples analitos simultáneamente.
  - Se pueden hacer medidas en muestras turbias o coloreadas.
  - Se pueden utilizar en operaciones de flujo continuo.
  - Se pueden hacer análisis con cantidades muy pequeñas de muestra.
  - Se pueden realizar medidas continuas (ideal para el control de bioprocesos) y medidas *in situ* (importante por sus aplicaciones médicas).
  - Su simplicidad operativa permite su utilización por personal no especializado.
  - Se pueden utilizar fuera del laboratorio, *in situ* y en condiciones de trabajo difíciles para otras técnicas operativas.
-



Uno de los mayores avances médicos de este siglo ha sido el desarrollo de la insulina para regular el metabolismo de la glucosa. La dosis de insulina debe ser ajustada de modo individual para minimizar la hiperglucemia mientras que se evita una hipoglucemia, esto requiere controles frecuentes y exactos para monitorizar los niveles de glucosa en sangre. El desarrollo de un biosensor de glucosa biocompatible junto a la implantación de una bomba de insulina artificial sería la solución de dicha enfermedad (20). Otros aspectos interesantes serían la detección del antígeno de la Hepatitis B o el antígeno del virus HTLV-II (SIDA) en sangre, lo que contribuiría además a la protección del personal que lo manipula.

Dentro de la *industria alimentaria* son útiles para controlar determinados procesos como la determinación de contaminantes, verificación de contenidos, control de la conversión de productos crudos y evaluación del grado de frescor de los alimentos (carne y pescado) (17). En este sentido es esencial el control de la posible contaminación de los alimentos por toxinas o microorganismos como son la *Salmonela* y *Listeria* y por pesticidas e insecticidas en muchos productos, incluyendo la leche, el vino y los zumos de frutas. Otros análisis igualmente útiles son los de alcohol en frutas, aldehídos en grasas, lactosa en leche y productos lácteos e histamina en pescado, lácteos y productos enlatados.

## 4. CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

La clasificación de los biosensores viene impuesta tanto por la naturaleza de la biocapa elegida como por el tipo del transductor empleado (2).

### 4.1. La biocapa

Teniendo en cuenta el componente biológico y la naturaleza del proceso bioquímico, los biosensores se pueden dividir en dos grandes categorías:

- Biosensores basados en reacciones de afinidad y catálisis: la reacción de reconocimiento va seguida de una modificación química del sustrato que hace posible la detección. Dentro de ellos cabe destacar los basados en enzimas, en microorganismos y en secciones de tejidos.

- Biosensores basados en reacciones de afinidad: se produce un enlace esencialmente

irreversible y no-catalítico. Las biomoléculas activas son anticuerpos, receptores biológicos y ácidos nucleicos.

En cualquiera de estos casos la biocapa es un componente clave en el desarrollo de un buen biosensor (21). Evidentemente debe ser estable y entonces nos adentramos en el problema de la inmovilización del componente biológico. Aunque hay rutas generales, la elección particular viene determinada por el tipo de biosustancia elegida, y en cualquier caso debe prestarse atención al hecho de que tratamos con biomoléculas intrínsecamente lábiles que son vulnerables en condiciones extremas de la disolución empleada, tales como pH, temperatura y fuerza iónica. En general, la matriz de inmovilización puede funcionar simplemente como un soporte, o puede tomar parte, como mediador, en el mecanismo de transducción de la señal asociada al analito.

### Inmovilización del componente biológico

Los métodos generales de inmovilización del componente biológico (2,22) se hallan esquematizados en la Fig. 3. Estos métodos incluyen adsorción física (en superficies hidrofílicas o hidrófobas), enlace químico en la superficie (silanización mediante enlace covalente), atrapamiento físico en hidrogeles o inclusión en polímeros (poliuretano, polipirrol, alcohol polivinílico, ...) o bien microencapsulación (por ejemplo en liposomas). En el caso de la adsorción física, las fuerzas de unión se deben principalmente a puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Al tratarse de fuerzas débiles, la biocapa es inesta-

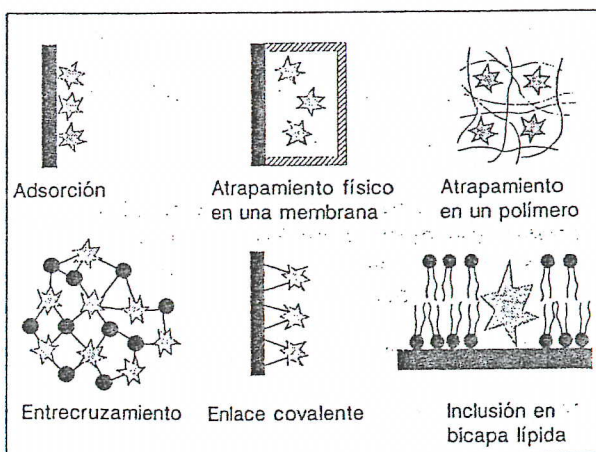


Fig. 3.-Métodos de inmovilización del componente biológico.



que le confiere al dispositivo: el analito o sustrato a determinar (S) reacciona con su enzima correspondiente dando lugar a un producto (P). El transductor puede medir bien el producto formado o bien el sustrato consumido. Aproximadamente se han caracterizado 2000 enzimas diferentes y un gran número de ellas se ha comercializado, razón que explica su amplia utilización como bioelemento en la construcción de biosensores. Con ellas, ha sido posible detectar más de 100 analitos diferentes. Según la reacción catalizada, las enzimas se pueden clasificar fundamentalmente en seis grupos, de los cuales, y para nuestros propósitos, son importantes las oxidoreductasas (transfieren electrones), las hidrolasas (hidrolizan enlaces) y algunas liasas (añaden pequeñas moléculas a dobles enlaces o viceversa) (22).

Las enzimas se pueden emplear como parte integrante de un biosensor siempre y cuando tengan una alta actividad, sean estables y fáciles de aislar e inmovilizar (21). Desafortunadamente muy pocas enzimas cumplen todos estos requisitos, por eso los sensores enzimáticos plantean, en ocasiones, algunos problemas como pobre estabilidad temporal, nivel de actividad específica insuficiente, necesidad de cofactores o imposibilidad de inmovilizar determinadas enzimas. Por ello, se ha intentado utilizar otro tipo de componentes biológicos como son secciones de tejidos o microorganismos.

#### *Biosensores basados en microorganismos*

Se pensó que al emplear células enteras que contienen a las enzimas y los cofactores necesarios en su medio ambiente natural, el tiempo de vida del biocomponente aumentaría considerablemente, confiriendo así estabilidad al biosensor (21, 23). En estos biosensores, lo que tiene lugar es una asimilación por los microorganismos de los compuestos orgánicos a determinar, un cambio en la actividad respiratoria y la producción de metabolitos electroactivos que son detectados directamente por el transductor, generalmente, electroquímico. Aunque se han desarrollado biosensores microbiales para determinar glucosa, ácido acético, etanol, metanol, amoníaco, trimetilamina y nistatina, hay algunos problemas para su desarrollo comercial, fundamentalmente, la falta de selectividad del dispositivo, dado el comportamiento multirreceptor de las células intactas, los tiempos de respuesta elevados y la necesidad de trabajar en condiciones estériles. A pesar de estos problemas, los biosensores microbiales están

dando buen resultado y abren una esperanzadora vía a la manipulación genética a través de la comprobación de las modificaciones realizadas (7).

#### *Biosensores basados en tejidos*

Para evitar los problemas planteados por el uso de células intactas se pensó en la posibilidad de emplear secciones de tejidos animales o vegetales, puesto que estas secciones también mantienen la enzima de interés en su medio natural pero sin llegar a la complejidad de una célula intacta, con la consiguiente estabilización de la actividad enzimática, confiriendo al biosensor tiempos de vida más altos (24). Se puede usar esta aproximación en aquellos casos en que no se pueda inmovilizar una determinada enzima. Así, se han utilizado tejidos de pulpa de plátano para medir dopamina, tejidos procedentes de granos de maíz para determinar piruvato o de pepino para cisteína. Dentro de los tejidos animales se ha empleado tejido de hígado de conejo para determinar guanina y de músculo de conejo para adenosina (21). El principal problema que tiene el trabajar con este tipo de biocomponente es el de aislar dichas secciones y mantenerlas intactas.

#### *4.1.2. Biosensores basados en afinidad*

Este tipo de biosensor es más conocido como *inmunosensor* ya que como capa receptora se emplea una capa de anticuerpos para monitorizar reacciones inmunológicas. Los anticuerpos son proteínas producidas en la médula y que actúan como defensa del organismo contra moléculas extrañas al mismo (antígenos). Tienen un peso molecular superior a 150.000 y están formados por dos cadenas polipeptídicas idénticas dos a dos, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, lo que les confiere la forma en Y con la que normalmente se les representa. Sin embargo, solo una pequeña parte de los brazos del anticuerpo contiene el lugar específico de enlace con el antígeno. La reacción entre estos lugares activos y el antígeno inicia una serie de procesos que producen la destrucción de este último. La inmunorreacción es sumamente específica ya que el tipo de enlace que se forma requiere un ajuste conformacional perfecto entre ambas moléculas. De aquí que las constantes de afinidad de estas reacciones sean relativamente altas ( $10^6$ - $10^{14}$ M<sup>-1</sup>) (22).



que implica capas receptoras de un único uso con el consiguiente encarecimiento del sensor. Algunas soluciones para conseguir un aumento de la reversibilidad, se basan en utilizar cambios bruscos de pH para provocar la ruptura del enlace antígeno-anticuerpo (24) o bien, según las investigaciones más recientes, se pueden usar péptidos sintéticos que mimetizan la parte activa de interacción del anticuerpo (los llamados minianticuerpos), controlando la densidad superficial de la capa receptora hasta llegar al óptimo funcionamiento del dispositivo (29). En la Fig. 6 se muestra un esquema de la dis-

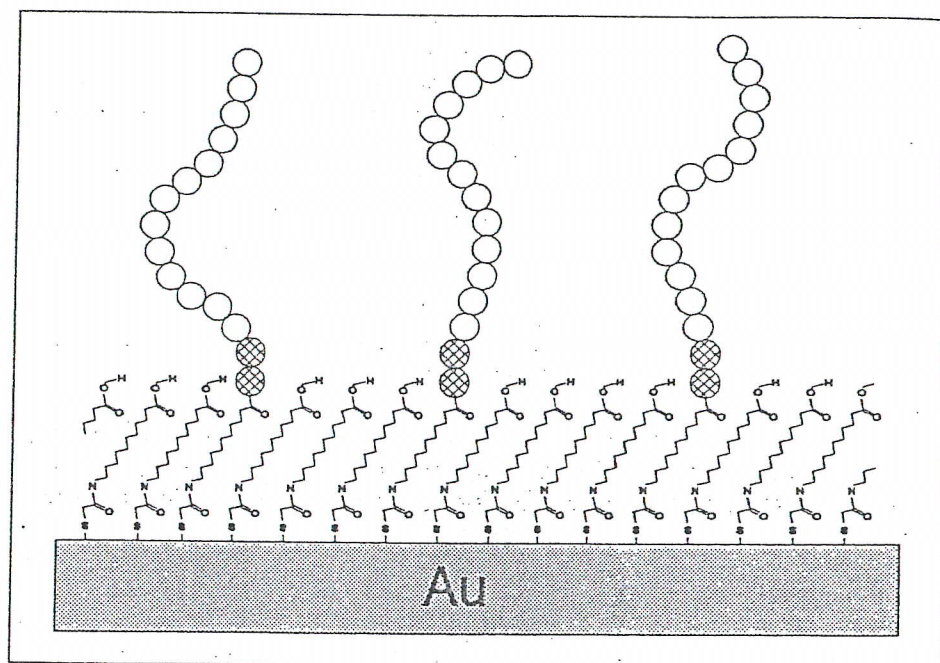


Fig. 6.-Péptidos sintéticos (minianticuerpos) empleados como capa receptora para aumentar la reversibilidad de la interacción inmunológica.

posición de estos minianticuerpos sobre la superficie del transductor.